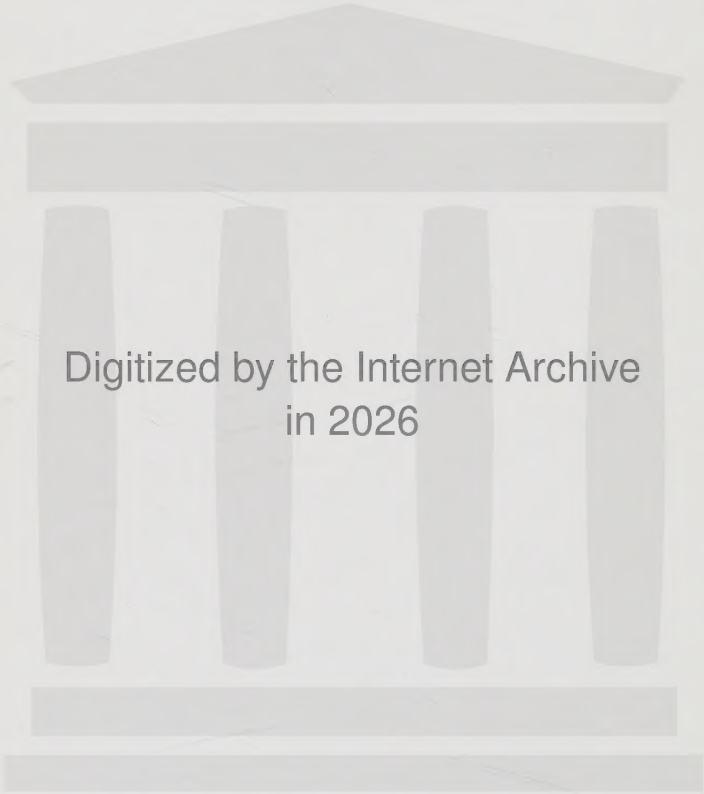


DIE METHODIK DER PHENOLROTBESTIMMUNG
IM PLASMA

ELEONORE KÖTH

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554425_0067

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor H. P. Wolff

DIE METHODIK DER PHENOLROTBESTIMMUNG
IM PLASMA

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen
Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Eleonore Köth aus Nossen/Sachsen

Mainz 1972

Dekan: Professor Dr.med. K.H. Bäßler
Referent: Professor Dr.med. Dietrich Höffler
Korreferent: Professor Dr.med. Hans Peter Wolff
Tag der mündlichen Prüfung: 25. 1. 1973

Gesamtherstellung: Ditters Bürodienst
Mainz/Heidesheim
Telefon (06132) 5711



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Methoden und Material	1
3. Ergebnisse	9
Zusammenfassung	26
Literaturverzeichnis	28

1. EINLEITUNG

Seit 1910 (11) wird die Bestimmung des Phenolrots (Phenolsulfonphthalein = PSP) im Urin als semiquantitative Nierenfunktionsprobe angewandt. Am weitesten verbreitet ist die Modifikation von MOELLER und BEDÖ (9). Da die Gewinnung des Urins große Fehlerquellen beinhaltet, wurde 1968 ein i.v. Phenolrottest angegeben (5), der sich stark an den verbreiteten Bromthaleintest anlehnt. Seitdem wurden Bestrebungen unternommen, diese Methode der Bestimmung des PSP's im Plasma zu verbessern (2,3,4,7,10,12).

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die verschiedenen Methoden zur Bestimmung des PSP im Plasma bzw. Serum auf ihre Anwendbarkeit in der klinischen Routinediagnostik geprüft werden. Dabei zeigen wir eine einfache, neue Methode, die auf zwei verschiedene Arten angewandt werden kann.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Bekannte Methoden

In der folgenden Aufstellung geben wir einen schematisierten Überblick über die in der Literatur angegebenen Bestimmungsmethoden der PSP-Konzentration im Plasma bzw. Serum, die von uns in Testreihen angewandt und bezüglich ihres Genauigkeitsgrades miteinander verglichen wurden. Wir vereinheitlichten die von den Autoren vorgegebenen Benennungen aus Gründen der Übersicht.

L =	Leerplasma, vor PSP-Injektion entnommen
ST =	Standardplasma (Leerplasma + bestimmtes Volumen einer Standardlösung)
P =	Probenplasma, nach PSP-Injektion gewonnen
E =	Extinktion
L_1 bzw. P_1 =	Leerplasma bzw. Probenplasma nach Zusatz von NaOH
L_2 bzw. P_2 =	Leerplasma bzw. Probenplasma nach Zusatz von NaOH
L_3 bzw. P_3 =	Leerplasma bzw. Probenplasma nach Zusatz von Puffer I Haury (pH 11,5)
L_4 bzw. P_4 =	Leerplasma bzw. Probenplasma nach Zusatz von Puffer I und II Haury (pH 11,5)
F =	Faktor

Der Faktor F ist die Umrechnungsgröße von den gemessenen Extinktionen auf die gesuchten PSP-Konzentrationen. Für unsere Methode ohne Standard gilt:

$$1) (E_{P1} - E_{L1}) \times F = \text{PSP-Konzentration}$$

$$\text{z.B. } (0,268 - 0,060) \times 1460 \text{ mcg PSP/100 ml} = 303,7 \text{ mcg PSP/100 ml}$$

Zur Faktorenbestimmung werden die Extinktionen bekannter PSP-Konzentrationen gemessen: z.B. bei einer bekannten PSP-Konzentration von 300 mcg PSP/100 ml wurden bestimmt:

$$E_{P1} = 0,268; E_{L1} = 0,060$$

Der Faktor errechnet sich wie folgt:

$$2) F = \frac{\text{PSP-Konzentration}}{(E_{P1} - E_{L1})}$$

$$F = \frac{300 \text{ mcg PSP/100 ml}}{0,268 - 0,060}$$

$$F = \frac{300 \text{ mcg PSP/100 ml}}{0,208}$$

$$F = 1440 \text{ mcg PSP/100 ml}$$

Als endgültiger Faktor fungiert der Mittelwert der Faktoren, die aus einer Anzahl von Messungen ermittelt wurden. Die Faktoren unterscheiden sich bei den verschiedenen Methoden. Wir entnahmen sie der Literatur und bestimmten sie nicht neu.

2.1.1. Nach der Methode von HÖFFLER, OFFERMANN und FRENZ bestimmten wir die Extinktionen von 2 ml Leerplasma und 2 ml Probenplasma vor und nach Zusatz von 0,2 ml 1 n NaOH.

$$3) (E_{P2} - E_{P1}) - (E_{L2} - E_{L1}) \times F = \text{mcg PSP/100 ml}$$

$$F = 1,43 \cdot 10^3 \text{ mcg PSP/100 ml}$$

2.1.2. Bei der Methode der Fa. Haury (8 München 23, Postfach 48) wurden die Extinktionen von 1 ml Leerplasma, 1 ml Standardplasma und 1 ml Probenplasma nach Zugabe von jeweils 1 ml Puffer I Haury (pH = 11,5) und erneut nach Zugabe von 0,1 ml Puffer II Haury (pH 3,4) gemessen. Das Standardplasma besteht aus 1 ml Leerplasma

des Patienten und 0,05 ml einer Standardlösung von Haury, so daß eine PSP-Konzentration von 500 mcg PSP/100 ml im Standardplasma vorliegt und der Faktor

$$F = 500 \text{ mcg PSP/100 ml}$$

ist.

$$4) \frac{(E_{P3}-E_{P4})-(E_{L3}-E_{L4})}{(E_{ST3}-E_{ST4})-(E_{L3}-E_{L4})} \times 500 \text{ mcg PSP/100 ml} = \text{mcg PSP/100 ml}$$

2.1.3. Die Methode LAMBERTS et al. benutzt die Differenz der Extinktionen von 2 ml Leerplasma und 2 ml Probenplasma nach Zugabe von 0,2 ml 1 n NaOH.

$$5) (E_{P2}-E_{L2}) \times F = \text{mcg PSP/100 ml}$$

$$F = 0,767 \times 10^3 \text{ mcg PSP/100 ml}$$

2.1.4. Nach der Vorschrift von FABRICIUS und MAROWSKI bestimmten wir die Extinktionen von 1 ml Leerplasma und 1 ml Probenplasma nach Zugabe von jeweils 2 ml Puffer I (pH 11,5) und erneut nach Zugabe von 0,1 ml Puffer II (pH 3,4).

$$6) (E_{P3}-E_{P4})-(E_{L3}-E_{L4}) \times F = \text{mcg PSP/100 ml}$$

$$F = 2,19 \times 10^3 \text{ mcg PSP/100 ml}$$

2.1.5. Nach der Methode SCHWARTZKOPFF wurden die Extinktionen von 3,8 ml des 1:5 verdünnten Leerplasmas und Probenplasmas nach Zusatz von 0,2 ml 10% iger NaOH und 6,0 ml isotonischer NaCL gemessen. Zusätzlich bestimmten wir jeweils einen Vergleichsstandard:

- 3,8 ml 1:5 verdünntes Leerplasma
- + 1,9 ml der 1:500 verdünnten Injektionslösung
- + 4,1 ml 0,9 % NaCL + 0,2 ml NaOH 10% ig.

Da dieser Vergleichsstandard eine PSP-Konzentration von 300 mcg PSP/100 ml enthielt, betrug der Faktor $F = 300 \text{ mcg PSP/100 ml}$.

$$7) \frac{(E_{P2}-E_{L2})}{E_{ST2}-E_{L2}} \times 300 \text{ mcg PSP/100 ml} = \text{mcg PSP/100 ml}$$

2.1.6. Bei PSP-Konzentrationen unter 0,4 mg% wurden nach der Methode von OCHWADTS und PITTS 2 ml Probenplasma 5 ml Aceton zugesetzt. Diese Lösung schüttelten wir kräftig und zentrifugierten sie. Nach Zugabe von 3 Tropfen 10% iger NaOH zentrifugierten wir erneut. Aus Mangel an dem betreffenden Material konnten wir die Vorschrift nicht genau einhalten, das Blut in verschlossenen Röhrchen zu zentrifugieren und das Plasma in diesen sofort in das Photometer zur Messung einzusetzen.

2.1.7. Nach der Methode HEIDLAND bestimmten wir die Extinktionen von 2 ml Leerplasma und 2 ml Probenplasma nach Zusatz von 2 ml 0,9% iger NaCL und 0,1 ml 10% iger NaOH.

Für jeden Patienten wurde eine eigene Eichkurve des Plasmas, das mit steigenden PSP-Konzentrationen versetzt wurde, aufgestellt:

die Extinktionen von 1 ml Leerplasma nach Zusatz von 0,262; 0,525; 0,788 und 1,050 mg% iger PSP-Lösung und jeweils 0,1 ml 10% iger Lösung wurden gemessen.

2.2. Eigene Methoden

2.2.1. Die Methode von LAMBERTS et al. ist sehr einfach und liefert vergleichsweise gute Werte (Tabelle 2). Wir konnten die Messgenauigkeit verbessern, indem wir statt 1 n NaOH einen von der Fa. Haury angebotenen 0,1 m Phosphatpuffer mit einem pH von 11,5 verwendeten. Dadurch erhielten wir eine stärkere Alkalisierung und einen vollständigen Farbumschlag des PSP. Der Versuchsablauf im weiteren als Methode Ia bezeichnet, sieht wie folgt aus:

Der Pat. muß 10 Stunden vor der Untersuchung nüchtern sein. Um Änderungen einer bestehenden Lipämie zu vermeiden, bleibt er im Zeitraum der Blutentnahme sitzen oder liegen. Das Blut läßt man in Blutbildröhrchen, die Heparin enthalten und 3 ml Blut fassen, oder in Röhrchen, die 1 Tropfen Heparin enthalten, abtropfen und zentrifugiert es 15 min. lang bei ca. 3500 U/min.

Zur Bestimmung der Phenolrot-Konzentration pipettierten wir 1 ml Leerplasma und 1 ml Probenplasma in jeweils eine 1 cm Küvette, fügten 1 ml Puffer I Haury (pH 11,5) hinzu, mischten gut und lasen die Extinktionen jeder Lösung sofort nach Pufferzugabe im Eppendorf-Photometer bei einer Wellenlänge von 546 mμ gegen Aqua dest. ab. Die PSP-Konzentrationen lassen sich mit Hilfe der Gleichung

$$(E_p - E_L) \times F = \text{mcg PSP/100 ml}$$

bestimmen.

Da bei der 3. + 4. Versuchsreihe die PSP-Konzentrationen bekannt waren, ließen sich die Faktoren nach der Gleichung (2) ermitteln.

Auf die gleiche Weise lassen sich die Faktoren bei den vorgegebenen Konzentrationen von 75 und 37,5 mcg PSP/100 ml ermitteln.

Zur Bestimmung der einzelnen PSP-Konzentrationen aus den gemessenen Extinktionen verwandten wir den Mittelwert X der einzelnen Faktoren innerhalb einer Versuchsreihe. Für die Versuchsreihen 2, 5, 6 und 7 benutzten wir den Mittelwert der Faktoren der 3. und 4. Versuchsreihe: $F = 1460 \text{ mcg PSP/100 ml}$.

- 2.2.2. Mit der Methode HEIDLAND erhielten wir gute Ergebnisse, weil u.a. für jeden Patienten eine eigene Eichkurve aufgestellt wurde. Wir bezogen daher in unsere Methode einen Standard mit ein, um Fehler durch besondere Eigenschaften der einzelnen Plasmen weitgehend zu eliminieren (Methode Ib).

Wir bestimmten die Extinktionen von 1 ml Leerplasma, 1 ml Standardplasma und 1 ml Probenplasma nach Zugabe von 1 ml Puffer I Haury (pH 11,5).

Das Standardplasma enthält 1 ml Leerplasma des jeweiligen Patienten und zusätzliche, 0,05 ml Standard der Fa. Haury. Diese geringe Menge kann exakt mit einer Konstriktionspipette abgemessen werden.

Die Konzentration des Standardplasmas beträgt 500 mcg PSP/100 ml Plasma. Die gesuchte PSP-Konzentration kann mit Hilfe der gemessenen Extinktionen und der bekannten Standardplasmakonzentration wie folgt errechnet werden:

$$8) \frac{(E_{P3} - E_{L3})}{(E_{ST3} - E_{L3})} = \frac{\text{gesuchte PSP-Konzentration}}{500 \text{ mcg PSP/100 ml}}$$

$$9) \frac{(E_{P3} - E_{L3})}{(E_{ST3} - E_{L3})} \times 500 \text{ mcg PSP/100 ml} = \text{gesuchte PSP-Konzentration}$$

- 2.2.3. Wir untersuchten, ob stärkere Verdünnungen die Meßgenauigkeit erhöhen und gaben statt 1 ml Puffer I Haury (pH 11,5) 2 ml zu den einzelnen Plasmen. Die Faktorbestimmung und Konzentrationsberechnungen dieser Methode II a ohne Standard erfolgte nach den Gleichungen der Methode I a, die dieser Methode II b mit Standard nach den Formeln von I b.

2.3. Durchführung in Versuchsreihen

Um alle 7 Methoden im gleichen Plasma parallel durchzuführen, wurden folgende Versuchsanordnungen aufgestellt, die weitgehendst den Forderungen der 7 Methoden entsprechen.

2.3.1. Versuchsreihe:

60 ml hämolysefreies und heparinisiertes Blut, jeweils von 1 Person, wurde 15 min. bei 2500 U/min zentrifugiert. Dem Plasma wurden 25 mcg einer PSP-Lösung von Merck (6 mg/10 ml) zugesetzt, so daß eine Konzentration von 150 mcg PSP/100 ml vorlag. Die Messungen dauerten bis zu 16 Stunden nach Blutentnahme. Die Konzentrationen wurden im Nüchternplasma, im lipämischen und hämolytischen (durch Aqua dest-Zugabe bzw. Einfrieren) sowie im Nüchternplasma, das über Nacht stand, rückbestimmt; die Plasmen wurden von insgesamt 8 Personen, je 2 unter derselben Bedingung, gewonnen.

2.3.2. Versuchsreihe (Versuche I - X):

10 Personen, die 12 Stunden nüchtern waren, wurde 300 ml Blut hämolysefrei entnommen und sofort im Auffanggefäß heparinisiert, bei 2500 - 3500 U/min 15 min. lang zentrifugiert und innerhalb von 8-16 Stunden gemessen. Da die PSP-Zugabe in so kleinen Mengen wie 25 mcg eine zusätzliche Fehlerquelle darstellen kann, stellten wir eine Verdünnungsreihe her. 2 ml einer 1:10 verdünnten PSP-Lösung Merck (6 mg/10 ml) wurden auf 20 ml mit unverdünntem Leerplasma aufgefüllt. Das Plasma enthielt eine Endkonzentration von 600 mcg PSP/100 ml. 15 ml dieses Plasmas wurden stufenweise 1:1 verdünnt mit Leerplasma, das mit Aqua dest 10:1 verdünnt worden war. Wir erhielten so Plasma-Konzentrationen von 300, 150, 75, 37,5 mcg PSP in 100 ml Plasma, die wir nach den oben angegebenen Methoden rückbestimmten.

Das Leerplasma wurde für die Messungen 10:1 verdünnt entsprechend der Verdünnung des PSP-Plasmas.

2.3.3. Versuchsreihe (Versuche 1 - 5):

5 Personen, die über 12 Stunden nüchtern waren, wurde ca. 50 ml Blut hämolysefrei entnommen, sofort heparinisiert und bei 3500 U/min zentrifugiert. Innerhalb

von 2 1/2 Stunden bestimmten wir nach den vereinfachten Methoden I a und I b sowie nach der Methode von Haury die PSP-Konzentration.

Zunächst stellten wir eine Verdünnungsreihe entsprechend den Angaben unter 2.2.2. her; statt 15 ml pipettieren wir nur 2 ml hinüber.

Da die hier beschriebenen Messungen ein Teil der Methode der Fa. Haury sind, wurden die zusätzlichen Messungen der Methode der Fa. Haury bestimmt und die Ergebnisse der Methoden I a + b und Haury miteinander verglichen.

2.3.4. Versuchsreihe 4:

Die mit der Methode der Fa. Haury und der Methode I b bestimmten Konzentrationen lagen zu hoch, da der Standard mit dem alkalischen Puffer angesetzt wurde und seine PSP-Konzentration mit der Zeit abnahm. Es wurde daher eine neue Versuchsreihe mit einem neuen nicht mehr alkalisierten Standard angesetzt und die Extinktionen, Faktoren und Konzentrationen wie bei der 3. bestimmt.

Von 10 Personen, die 12 Stunden nüchtern waren, wurden ca. 50 ml in einem Kolben, der 0,5 ml Heparin enthielt, aufgefangen. Die Messungen dauerten 1 1/2 - 3 Stunden.

Analog den bisherigen Versuchsreihen wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt.

2.3.5. Versuchsreihe:

Die Methoden I a und I b, II a und II b wurden im Plasma von 10 Personen angewandt, die nicht nüchtern waren; das Plasma war also in verschiedenen Graden lipämisch. Die Messungen dauerten bis zu 5 Stunden, das Blut wurde bei 3500 U/min zentrifugiert.

2.3.6. Versuchsreihe:

Die Methoden I a, I b, II a und II b wurden im Plasma von 8 Personen angewandt, die 12 Stunden nüchtern waren. Das Blut wurde anschließend an die Blutentnahme länger und kräftig geschüttelt und dadurch eine sichtbare Hämolyse erreicht. Anschließend wurde es bei 3500 U/min 15 min. lang zentrifugiert. Die Messungen dauerten bis zu 9 Stunden.

2.3.7. Versuchsreihe:

Wir bestimmten bei 23 Hämodialysepatienten und 1 anderen Patienten die Sollgewichte über die PSP-Raummessung. Dazu ermittelten wir nach den Methoden I a und I b die PSP-Konzentrationen 20, 30, 40, 50 und 60 min p.i. von 60 mg PSP. Diese PSP-Konzentrationen trugen wir in logarithmischem Maßstab auf der Ordinate gegen die Zeit auf der Abzisse auf und erhielten eine Gerade. Durch deren Rückverlängerung bis zum Zeitpunkt 0 min gewannen wir die PSP-Konzentration zu diesem Zeitpunkt (P_0). Das Verteilungsvolumen ließ sich dann wie folgt bestimmen (6):

$$10) \quad \text{Verteilungsvolumen} = \frac{\text{Dosis}}{P_0}$$

Das Verteilungsvolumen des PSP zum Zeitpunkt 0 min entspricht dem aktuellen PSP-Raum (PSPR_{akt}). Bei Normalpersonen wurden als Mittelwert des PSP-Raumes 18,63 % des Körpergewichtes ermittelt (6). Aus beiden Werten und dem aktuellen Körpergewicht (KG_{akt}) errechneten wir, um welchen Betrag das aktuelle Gewicht über bzw. unter dem zu fordernden liegt:

$$11) \quad \text{PSPR}_{\text{akt}} (\% \text{KG}_{\text{akt}}) - 18,63 (\% \text{KG}_{\text{akt}}) = \text{PSPR} (\% \text{KG}_{\text{akt}})$$

Das Sollgewicht (KG_{id}) bestimmten wir nach der Gleichung:

$$12) \quad \text{KG}_{\text{akt}} - \frac{\text{PSPR} \times \text{KG}}{100} = \text{KG}_{\text{id}}$$

2.3.8. Versuchsreihe:

Im klinischen Labor der Universitätsklinik wurden 70 Seren eines Tages mit Heglostix-Teststäbchen auf Hämolyse getestet: 1 Serum war sichtbar stark hämolytisch und Benzidin stark positiv, 2 Seren waren sichtbar gering hämolytisch und Benzidin mäßig positiv, 67 Seren waren nicht sichtbar hämolytisch, aber alle Benzidin schwach positiv.

2.3.9. Versuchsreihe:

10 Plasmen wurden mit Heglostix-Teststäbchen geprüft. 2 waren mäßig positiv, 8 schwach positiv, entsprechend der auf der Packung angegebenen Farbskala.

2.3.10. Versuchsreihe:

5 Plasmen zeigten mit Heglostix vor und nach Zugabe von Zinkacetatpulver die gleiche Reaktion: 3 schwach positiv, 2 mäßig positiv. Das Zinkacetatpulver führte in allen Fällen zu starker Eiweißausfällung.

2.3.11. Versuchsreihe:

7 Plasmen ergaben mit Heglostix schwach bis mäßig positive Blaufärbung, nach Zusatz sehr hoher (ca. 30 mg%) PSP-Konzentrationen schwach positive Grünfärbung.

2.3.12. Versuchsreihe:

5 Plasmen zeigten mit Heglostix vor und nach Zugabe von Puffer I (pH 11,5) Haury keine Reaktion.

2.3.13. Versuchsreihe:

7 sichtbar hämolytische Plasmen wurden je in 2 Portionen geteilt und parallel jeweils die Heglostix-Reaktion im hämolytischen Plasma ohne und mit PSP-Konzentrationen (ca. 6 - 12 000 mcg PSP/100 ml) als mäßig positiv in allen Ansätzen bestimmt.

3. E R G E B N I S S E :

In der Literatur werden 7 in Tabelle 1 aufgeführte Methoden zur Phenolrotbestimmung im Plasma angegeben.

3.1. Wir bestimmten die Phenolrotkonzentration mit Hilfe der 7 Methoden im Nüchtern-Plasma, das eine Phenolrot-PSP-Konzentration von 150 mcg PSP/100 ml enthielt (Tabelle 1, I).

Da die Konzentrationen erhebliche Schwankungen untereinander bei 2 verschiedenen Plasmen, sowie Abweichungen von 150 mcg PSP/100 ml zeigten, war unser nächster Schritt, mögliche störende Einflüsse von Lipämie, Hämolyse und durch die Aufbewahrungszeit bedingte Einflüsse (Blut blieb über Nacht stehen) zu erfassen (Tabelle 1, II-IV). Die Konzentrationen nach der Methode der Fa. Haury lagen bei uns zu hoch, die mit den Methoden OFFERMANN et al, und LAMBERTS et al

bestimmen bis auf jeweils 1 herausfallenden Wert relativ nah um den Wert 150 mcg PSP/100 ml, die übrigen Methoden wichen sehr stark voneinander und von 150 mcg PSP/100 ml ab.

Die Beurteilung der Methode OCHWADT und PITTS ist schwierig, da keine genaue Vorschrift gegeben ist, wie man aus den Extinktionen die Konzentrationen ermittelt.

Um die einzelnen Methoden besser beurteilen zu können, bestimmten wir nach den 7 Methoden die PSP-Konzentrationen, die wir anhand einer Verdünnungsreihe variierten. Das Plasma der 10 Personen enthielt jeweils die Konzentrationen:

300 mcg PSP/100 ml, 150; 75; 37,5 mcg PSP/100 ml.

Die Ergebnisse zeigt Tabelle 2.

3.2. Ergebnisse:

Für die Bestimmung der PSP-Konzentration aus den gemessenen Extinktionen ist für jede Methode der entsprechende Faktor notwendig. Die Faktoren der Methoden von OFFERMANN et al., LAMBERTS et al. und von FABRICIUS und MAROWSKI entnahmen wir der Literatur und bestimmten sie nicht neu, daher sind bei diesen Methoden geringe Abweichungen des Mittelwertes der PSP-Konzentrationen vom Sollwert kein Hinweis auf die Ungenauigkeit der Methode. Der Variationskoeffizient, der die Standardabweichung in % des arithmetischen Mittels angibt, ist wie diese ein Hinweis auf die Genauigkeit der Methode.

- 3.2.1. Die Methode OFFERMANN et al. ergab Mittelwerte der PSP-Konzentrationen, die 16-6 % höher lagen als der Sollwert und Variationskoeffizienten von 12-58 (Tabelle 2, Seite 12).

Die erste Zahl bezieht sich bei diesen wie den folgenden Angaben auf eine PSP-Konzentration von 300 mcg PSP/100 ml und die zweite Zahl auf die geringste PSP-Konzentration von 37,5 mcg PSP/100 ml.

- 3.2.2. Die Mittelwerte der rückbestimmten PSP-Konzentrationen lagen bei der Methode der Fa. Haury in der 2. Versuchsreihe 95-100 % über dem Sollwert und hatten Variationskoeffizienten von 12-20 (Tabelle 2, Seite 12); in der 3. Versuchsreihe lagen sie 33-47 % über dem Sollwert und zeigten Variationskoeffizienten von 1,4 - 22,0 (Tabelle 3, Seite 15). Nach Verwendung eines neuen Standards, der nicht

Methode	I. nüchtern	II. nüchtern über Nacht	III. lipämisch	IV. hämolytisch
1. OFFERMANIN et al	a) 245,9 b) 172,0	c) 162,2 d) 188,7	e) 150,1 f) 117,3	g) 153,0 h) 158,7
2. HAURY	a) 280,4 b) 339	c) 281,4 d) 333,3	e) 338,0 f) 298,2	g) 293,9 h) 297,2
3. LAMBERTS et al.	a) 124,25 b) 149,5	c) 75,9 d) 161,8	e) 161,8 f) 171,4	g) 134,2 h) 140,8
4. FABRICIUS MAROWSKI	a) 177,3 b) 126,4	c) 348,2 d) 181,7	e) 192,7 f) 85,4	g) 54,7 h) 148,9
5. SCHWARTZ- KOPFF	a) 231,2 b) 126,0	c) 150 d) 222	e) 180,0 f) 216	g) 145,0 h) 216
6. OCHWADT- PITTS	a) 0,112 b) 0,079	c) 0,102 d) 0,057	e) 0,100 f) 0,088	g) 0,092 h) 0,062
7. HEIDLAND	a) 240 b) 220	c) 210 d) 153	e) 287 f) 178	g) 281 h) 160

Tabelle 1: In der 1. Versuchsreihe unter 4 verschiedenen Bedingungen bei jeweils 2 anderen Personen (Personen a-h) rückbestimmte PSP-Konzentrationen, Sollwert: 150 mcg PSP/100 ml.

Methode	Faktor mcg PSP/100 ml	eingegebene PSP-Menge			
		300	150	75	37,5 mcg PSP/100 ml
1. OFFERMANIN et al.	1430	$\bar{X}$ 349,9	176,0	82,4	40,0
		S 41,3	35,3	27,0	23,7
		V 11,8	20,1	32,8	57,5
2. Fa. HAURY	500	$\bar{X}$ 585,9	285,0	141,0	74,6
		S 67,9	50,3	40,1	15,1
		V 11,6	17,6	28,4	20,2
3. LAMBERTS et al.	767	$\bar{X}$ 312,2	154,5	71,6	30,8
		S 14,6	15,1	11,7	12,0
		V 4,7	9,8	16,3	39,0
4. FABRICIUS u. MAROWSKI	2190	$\bar{X}$ 334,4	155,0	73,5	34,1
		S 73,8	27,5	29,4	21,6
		V 22,1	17,7	40,0	63,4
5. SCHWARTZ- KOPFF	300	$\bar{X}$ 319,7	171,8	88,9	46,2
		S 50,8	39,2	18,2	17,1
		V 15,9	22,8	20,5	37,0
6. OCHWADT u. PITTS		$\bar{X}$ 0,1273	0,0698	0,0404	0,0262
		S 0,0046	0,055	0,0034	0,0042
		V 3,6	7,9	8,4	16,0
7. HEIDLAND		$\bar{X}$ 310,4	152,7	73,9	33,6
		S 9,6	8,5	6,3	7,4
		V 3,1	5,6	8,5	22,1
I. a	1460	$\bar{X}$ 314,2	157,5	78,0	39,2
		S 10,8	10,0	5,7	10,3
		V 3,4	6,3	7,3	26,3
I. b	500	$\bar{X}$ 602,9	302,4	149,5	74,6
		S 23,1	17,9	9,8	18,2
		V 3,8	5,9	6,6	24,4

Tabelle 2: 2. Versuchsreihe m.d. Methoden 1-7, I a + b, rückbestimmte PSP-Konzentrationen bei 10 Personen. Bei Methode 6 sind statt Konzentrationen nur Extinktionen angegeben.

X = Mittelwert, S = Standardabweichung, V = Variationskoeffizient

mehr alkalisch war, in der 4. Versuchsreihe, erhielten wir Mittelwerte der PSP-Konzentrationen, die 3 - 6 % größer waren als der Sollwert und Variationskoeffizienten von 25 - 107 (Tabelle 4, Seite 17).

- 3.2.3. Bei der Methode von LAMBERTS et al. waren die Mittelwerte der PSP-Konzentrationen um 5 % größer bis 18 % kleiner als der Sollwert und die Variationskoeffizienten 4,7 - 39,0 (Tabelle 2, Seite 12).
- 3.2.4. 12 % größer bis 9 % kleiner als der Sollwert waren die Mittelwerte der PSP-Konzentrationen, die wir nach der Methode von FABRICIUS und MAROWSKI bestimmten. Als Variationskoeffizienten ermittelten wir 22 - 63 (Tabelle 2, Seite 12).
- 3.2.5. Mit der Methode SCHWARTZKOPFF erhielten wir Abweichungen vom Sollwert von 7,33 % und Variationskoeffizienten von 15,9 - 37 (Tabelle 2, Seite 12).
- 3.2.6. Bei der Methode von OCHWADT und PITTS können nur die Standardabweichungen und Variationskoeffizienten zur Beurteilung benutzt werden : $V = 3,6 - 16,0$ (Tabelle 2, Seite 12).
- 3.2.7. Die Mittelwerte der PSP-Konzentrationen, die wir nach der Methode von HEIDLAND ermittelten, waren 4 % höher bis 10 % niedriger als der Sollwert. Die Variationskoeffizienten betrugen: 3,1 - 22,1 (Tabelle 2, Seite 12).
- 3.2.8. Den Faktor für die eigene Methode I a ermittelten wir aus der 3. und 4. Versuchsreihe mit $F = 1460 \text{ mcg PSP}/100 \text{ ml}$ und $s = 77 \text{ mcg PSP}/100 \text{ ml}$. Die Mittelwerte der rückbestimmten PSP-Konzentrationen liegen 4,7 - 4,5 % über dem Sollwert. Als Variationskoeffizienten errechneten wir 3,4 - 26,3 (Tabelle 2, Seite 12).
- 3.2.9. Nach der Methode I b bestimmten wir Mittelwerte der PSP-Konzentrationen, die um 101 - 100 % höher lagen als der Sollwert; neben diesen extrem zu hohen Werten erhielten wir aber Variationskoeffizienten von 3,8 - 24,4 (Tabelle 2, Seite 12).
- In der 3. Versuchsreihe lagen die Mittelwerte der PSP-Konzentrationen ebenfalls hoch: 34 % - 31 % über dem Sollwert, dagegen waren die Variationskoeffizienten mit 2,0 - 10,2 relativ niedrig (Tabelle 3, Seite 15). Nach der Verwendung eines neuen Standards der Fa. Haury, der nicht mehr alkalisch war, erhielten wir in

der 4. Versuchsreihe Mittelwerte, die um 2 % bis 3 % unter dem Sollwert lagen, und Variationskoeffizienten von 2,2 - 6,0 (Tabelle 4, Seite 17).

- 3.2.10. Bei dem Vergleich der verschiedenen Methoden miteinander fallen in der 2. und 3. Versuchsreihe die extrem hohen Mittelwerte der Methoden der Fa. Haury und der eigenen Methode I b auf. Da I b sich von I a nur in der Verwendung eines Standards unterscheidet und I a brauchbare Werte lieferte, verwandten wir in der 4. Versuchsreihe einen neuen Standard, den die Fa. Haury uns nach Rücksprache lieferte.

Er wurde nicht mehr in alkalischem Milieu angeboten. Wir erhielten damit Mittelwerte der PSP-Konzentrationen, die in der Nähe des Sollwertes lagen (Tabelle 4, Seite 17).

Die Methoden von OFFERMANN et al., von FABRICIUS und MAROWSKI, von SCHWARTZKOPFF und die Methode der Fa. Haury wiesen bei allen Konzentrationen Variationskoeffizienten von über 11 und damit eine hohe Meßgenauigkeit auf.

Die übrigen Methoden ergaben bei Konzentrationen von 300 mcg PSP/100 ml Variationskoeffizienten, die alle kleiner als 5 waren. Bei Konzentrationen von 150 mcg PSP/100 ml erhielten wir nach der Methode von LAMBERTS et al. einen hohen Variationskoeffizienten V von 10, nach der Methode von OCHWADT und PITTS $V = 8$, nach dem METHODEN von HEIDLAND und den eigenen Methoden I a + b $V = 6$. Bei Konzentrationen von 75 mcg PSP/100 ml ist V jeweils gering größer und bei Konzentrationen von 37,5 mcg PSP/100 ml unbrauchbar groß (Tabelle 2, Seite 12).

In der 3. Versuchsreihe konnten nach der METHODE I b bei den Konzentrationen 300 - 75 mcg PSP/100 ml Variationskoeffizienten erreicht werden, die kleiner bzw. gleich 3 waren, bei Konzentrationen von 37,5 mcg PSP/100 ml in der 3. Versuchsreihe $V = 10$ und in der 4. Versuchsreihe $V = 6$ (Tabelle 3, Seite 15).

- 3.3. Wir prüften, ob Lipämie die Meßgenauigkeit der Methoden beeinflusst und untersuchten 10 Plasmen von Personen, die nicht nüchtern waren. Im Vergleich mit

- 3.3.1. den guten Ergebnissen der Methode I b in der 4. Versuchsreihe liegen hier die Mittelwerte 5 - 10 % höher als der Sollwert. Die Variationskoeffizienten V sind gering größer (Tabelle 5, Seite 18).

Methode	Faktor mcg PSP/100 ml	eingegebene PSP-Konzentrationen		
		300	150	75
I a	$\bar{X}$ 1484			37,5 mcg PSP/100 ml
	S 100			
	V			
I b	$\bar{X}$ 500	392,4	195,3	96,7
	S	7,7	5,2	2,2
	V	2,0	2,7	2,3
Fa. HAURY	$\bar{X}$ 500	399,2	205,3	107,3
	S	5,3	12,3	15,7
	V	1,4	6,0	14,6
				55,9
				11,4
				22,0

Tabelle 3: 3. Versuchsreihe, bestimmte Faktoren und PSP-Konzentrationen nach den Methoden I a + b und der Methode der Fa. Haury.

- 3.3.2. Nach der Methode I a liegen die Mittelwerte der PSP-Konzentrationen höher als die nach Methode I b bestimmten. Die Variationskoeffizienten V sind besser als die der Methode I b und deutlich besser als die der Methode I a der 2. Versuchsreihe.
- 3.3.3.+4. Die Methoden II a und b sind ungenauer als die Methoden I a und II b (Tabelle 5, Seite 18).
- 3.4.1. Im hämolytischen Plasma lagen die Mittelwerte der PSP-Konzentrationen nach der Methode I a um 7 % - 6 % über dem Sollwert. Die Variationskoeffizienten
- 3.4.2.-4. waren mit 2,9 - 14 größer als in Plasmen nüchterner und nicht nüchterner Personen. Für die Methode I b gilt das gleiche. Die Methoden II a + b wiesen keine besseren Ergebnisse auf als I a + b (Tabelle 6, Seite 19).
- 3.5.1. Wir bestimmten bei 23 Hämodialyse-Patienten vor der Dialyse und bei einem anderen Patienten das Sollgewicht über die Phenolrotraumbestimmung mit Hilfe der Methode I b. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 7, Seite 20.
- 3.5.2. Gleichzeitig bestimmten wir das Sollgewicht nach der Methode I a. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 7, Seite 20.
- 3.5.3. Um die Ergebnisse der Methoden zu vergleichen, wurde der t-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Mit diesem Test wurde der Mittelwert der Paardifferenzen auf Null getestet. In unserem Fall ergab sich $\bar{d} = -0,211$ mit der Standardabweichung $s = 0,37$. Die Testgröße ist $t = -2,39$ (Freiheitsgrade = $17=n-1$). Der Vergleich mit den tabellierten Werten ergab eine statistisch auffällige Abweichung dieses Mittelwertes von Null (Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %). Die Methode I a lieferte demnach meist gering größere Sollgewichte als die Methode I b. Die Ursache kann in dem zu hohen Faktor $F = 1460 \text{ mcg PSP}/100 \text{ ml}$ liegen, da sich auch in der 2., 5. und 6. Versuchsreihe vergleichsweise hohe Mittelwerte der PSP-Konzentrationen ergaben.
- In Seren wie in Plasmen, die nicht sichtbar hämolytisch sind, zeigen Heglostix-Teststäbchen eine schwach positive Reaktion, in sichtbar hämolytischem Plasma eine mäßig bis starke Reaktion, die durch Zugabe von PSP, Zinkacetat und von Puffer I ($p_H 11,5$) Haury nicht beeinträchtigt wird.

Methode	Faktor mcg PSP/100 ml	eingeebene PSP-Konzentrationen		
		150	75	37,5 mcg PSP/100 ml
I a	1448 77	$\bar{X}$		
		S		
		V		
I b	500	$\bar{X}$	147,4	73,3
		S	3,0	2,2
		V	2,2	3,0
Fa. HAURY	500	$\bar{X}$	290,0	139,8
		S	72,5	54,6
		V	25,0	39,3
				36,7
				2,2
				6,0
				39,9
				42,6
				106,8

Tabelle 4: 4. Versuchsreihe bestimmte Faktoren und PSP-Konzentrationen nach den Methoden I a + b und der Methode der Fa. Haury.

Methode	Faktor mcg PSP/100 ml	eingeebene PSP-Menge		
		300	150	75
I a	$\bar{X}$	323,9	161,6	83,2
	S	4,4	3,2	3,4
	V	1,4	2,0	4,1
I b	$\bar{X}$	315,7	157,4	81,0
	S	7,9	4,6	4,0
	V	2,5	2,9	4,9
II a	$\bar{X}$	310,3	152,2	78,3
	S	6,2	6,2	5,1
	V	2,0	4,7	6,5
II b	$\bar{X}$	311,0	153,3	78,5
	S	9,3	5,0	4,6
	V	3,0	3,3	5,9
				37,5 mcg PSP/100 ml
				41,5
				2,3
				5,5
				40,4
				2,7
				6,7
				38,6
				7,0
				18,2
				37,8
				7,3
				19,4

Tabelle 5: 5. Versuchsreihe mit den Methoden I a + b und II a + b bestimmte PSP-Konzentrationen im Plasma von nicht nüchternen 10 Personen.

Methoden	Faktoren mcg PSP/100 ml	eingeegebene PSP-Menge			37,5 mcg PSP/100 ml
		150	75		
I a	$\bar{X}$ 1460	319,7	161,2	81,4	39,9
	S	9,3	7,3	7,1	5,6
	V	2,9	4,5	8,7	14,0
I b	$\bar{X}$ 500	311,9	157,2	79,4	38,8
	S	8,9	6,5	7,2	4,5
	V	2,9	4,1	9,1	11,6
II a	$\bar{X}$ 2059	307,1	153,5	78,0	36,7
	S	10,6	6,2	9,9	3,3
	V	3,5	4,0	12,7	9,0
II b	$\bar{X}$ 500	307,4	153,7	78,1	36,7
	S	11,9	5,8	10,2	3,2
	V	3,9	3,9	13,2	8,7

Tabelle 6: 6. Versuchsreihe (8 Personen) mit den Methoden I a + b und II a + b rückbestimmte PSP-Konzentrationen im hämolytischen Plasma.

Patient	Sollgewicht n. Methode I a	Sollgewicht n. Methode I b	akt. Gew.	Klinik
1	70,6	71,0	75,1	überwässert
2	67,9	67,6	69,9	"
3	55,7	56,0	57,7	gering "
4	51,3	51,2	54,0	überwässert
5	46,5	46,7	47,2	WHH ausgegl.
6	62,7	62,9	62,7	WHH ausgegl.
7	67,4	66,4	73,5	überwässert
8	67,2	66,6	71,6	"
9	59,6	58,9	62,3	, "
10	52,7	52,3	56,0	"
11	71,7	71,3	71,0	WHH ausgegl.
12	44,6	44,3	49,0	überwässert
13	70,5	69,7	75,1	"
14	51,5	51,2	53,9	"
15	68,2	68,2	70,1	gering "
16	54,3	54,0	59,5	überwässert
17	74,3	74,3	74,6	WHH ausgegl.
18		63,6	66,5	überwässert
19		49,9	56,0	überwässert
20		60,0	66,4	"
21		71,1	72,0	WHH ausgegl.
22		81,6	86,1	überwässert
23		43,2	49,3	überwässert
24	84,7	84,8	81,5	Exsikkose

Tabelle 7: gibt die Sollgewichte, die zugehörigen aktuellen Gewichte und die Klinik bei 23 Hämodialysepatienten (1 - 23) und 1 anderen Patienten an. WHH = Wasserhaushalt.

4. DISKUSSION

Eine Methode, die für die Routinediagnostik geeignet ist, muß einfach in der Handhabung und genau sein. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse nach den verschiedenen Methoden, die im Nüchternplasma angewandt wurden, dargestellt.

Die nach den Methoden OFFERMANN et al., von der Fa. HAURY, FABRICIUS und MAROWSKI und SCHWARTZKOPFF rückbestimmten PSP-Konzentrationen weisen jeweils große Abweichungen vom Sollwert, große Standardabweichungen und Variationskoeffizienten auf. Wir entnahmen die Faktoren für die jeweiligen Bestimmungsmethoden der Literatur und ermittelten sie nicht neu. Geringe Abweichungen vom Sollwert sind aus diesem Grund kein eindeutiger Hinweis auf die Ungenauigkeit der Methode. Ein zuverlässiger Beweis ist dagegen die Standardabweichung S und der Variationskoeffizient V .

4.1. Die wenig genauen Ergebnisse nach den Vorschriften von OFFERMANN et al. entsprechen den Ergebnissen der Untersuchungen von FABRICIUS und MAROWSKI über diese Methode (2).

4.1.1. Das Ergebnis der Messungen im nicht alkalisierten Plasma ist sehr stark pH -abhängig. Zur Zeit der Messung kann bereits ein Teil des PSP in der Farbe durchgeschlagen sein.

Durch Zugabe von 0,2 ml 1 n NaOH wird das Plasma nicht stark genug alkalisiert und kein vollständiger Farbumschlag des PSP erreicht. Wir erfaßten bei der Messung vor NaOH-Zugabe oft bereits eine gewisse PSP-Konzentration, nach NaOH-Zugabe aber nicht die gesamte PSP-Konzentration.

Die Beurteilung der aktuellen PSP-Konzentration im Plasma ist daher nicht möglich.

4.2. Bei dem Vorgehen nach der Methode der Fa. Haury ist diese Fehlerquelle ausgeschaltet. Hier treten aber nach Ansäuern mit Puffer II der Fa. Haury (pH 3,4) in einigen Plasmen so starke Trübungen auf, daß im Einzelfall kein sinnvolles Ergebnis vorliegen kann, was in der großen Standardabweichung und dem großen Variationskoeffizienten zum Ausdruck kommt.

Ein inzwischen behobener Fehler lag bei den Versuchsreihen 1, 2 und 3 in dem Standard. Er wurde zuerst in alkalischem Milieu geliefert. PSP ist darin nicht be-

ständig. Die verwendeten Standards enthielten eine geringere Konzentration als angegeben. So ließen sich die zu hohen, errechneten PSP-Konzentrationen erklären.

Für die folgenden Versuchsreihen erhielten wir nach Rücksprache mit der Fa. Haury einen neuen Standard von der Fa. Haury in wässriger Lösung und gewonnen brauchbare Mittelwerte (Tabelle 4).

- 4.3. Bei der Anwendung der Vorschrift nach FABRICIUS-MAROWSKI benutzten wir an Stelle der vorgeschriebenen Puffer (pH 11,5 u. pH 3,4) die von HAURY gelieferten und mußten ebenfalls zum Teil starke Trübungen feststellen, die die großen Standardabweichungen und hohen Variationskoeffizienten der Ergebnisse bedingten (Tabelle 2). Ob bei der Verwendung der Puffer I und II von FABRICIUS und MAROWSKI keine derartigen Trübungen auftreten, wurde nicht geprüft und ist von der wenig unterschiedlichen Pufferzusammensetzung her nicht anzunehmen.
- 4.4. Die Ursache der ungenauen Meßergebnisse nach SCHWARTZKOPFF kann:
 1. in der Vielzahl der Meßvorgänge,
 2. in der starken Verdünnung liegen, die den Nachweis geringer PSP-Konzentrationen sehr erschwerte.SCHWARTZKOPFF gibt selber an, daß Konzentrationen unter 0,1 mg % nicht exakt nachgewiesen werden können.
- 4.5. Die Methode HEIDLAND, die von den 7 geprüften Methoden die genaueste ist, ist sehr aufwendig: für jeden Patienten muß eine eigene Eichkurve bestimmt werden, um Störungen durch Lipämie und besondere Bluteiweiß-Konstellationen zu erfassen. Diese Methode kann also für die Praxis nicht empfohlen werden.
- 4.6. Die Methode LAMBERTS et al. ergibt relativ gute Werte, die aber durch stärkere Alkalisierung verbessert werden, wie bereits FABRICIUS und MAROWSKI feststellten.
- 4.7. Die Acetonextraktionsmethode von OCHWADT und PITTS entspricht in ihrer Meßgenauigkeit, die wir aus der Standardabweichung der Extinktionen ersahen, der Methode HEIDLAND, ist aber ebenfalls aufwendig und zeitraubend.

4.8. Die genannten Fehlerquellen vermieden wir durch sehr starke Alkalisierung, durch Weglassen der Ansäuerung, durch die Einfachheit der Versuchsanordnung und durch Einbeziehen eines Standards bei der Methode I b. Diese Methode I b ist an den Mittelwerten der rückbestimmten PSP-Konzentrationen und deren Standardabweichungen S und Variationskoeffizienten V zu beurteilen. In der 1., 2. und 3. Versuchsreihe erhielten wir zu hohe PSP-Konzentrationen, da der Standard in alkalischem Milieu geliefert wurde; nach Verwendung eines neuen, nicht alkalischen Standards bestimmten wir die PSP-Konzentrationen bei 300 mcg PSP/100 ml nur um 2,3 %, bei 150 um 1,7 %, bei 75 um 2,3 % und bei 37,5 mcg PSP/100 ml um 21 % niedriger als der Sollwert war. Die Ursache kann 1. in ungenauer PSP-Eingabe liegen, zu der wir Blutzuckerpipetten verwandten. Bei späteren Untersuchungen verwandten wir die sehr genauen Konstriktionspipetten. Die 2. Ursache kann im Standard liegen, der eine höhere Konzentration als angegeben war enthielt. Diese mögliche Fehlerquelle kann darauf beruhen, daß der Standard und das verwandte PSP nicht der gleichen Charge entstammten. Der Standard wurde nachgeliefert, weil die bisher in alkalischem Milieu gelieferten Standards nicht stabil waren. Standard und PSP-Lösung müssen der gleichen Charge entstammen, weil während der Zubereitung der PSP-Lösungen geringe Mengen bei den einzelnen Arbeitsgängen auskristallisieren können und somit die Endkonzentration in einer gewissen Fehlerbreite um den Sollwert schwanken kann.

Die Standardabweichung S und der Variationskoeffizient V sind bei der Methode I b in der 4. Versuchsreihe sehr gering: bei Konzentrationen von 300 - 75 mcg PSP/100 ml ist V kleiner bzw. gleich 3. In diesem Bereich ist eine hohe Meßgenauigkeit möglich, im Bereich um 37,5 mcg PSP/100 ml ist sie mit $V = 6$ etwas geringer. Trotz extrem hoher Mittelwerte waren auch in der 2. Versuchsreihe die Variationskoeffizienten dieser Methode genau so klein wie die der Methode von HEIDLAND, OCHWADT und PITTS und der Methode I a.

4.9. Für die Methode I a ermittelten wir aus der 3. und 4. Versuchsreihe den Mittelwert der Faktoren $F = 1460$ mcg PSP/100 ml und erhielten in der 2. Versuchsreihe PSP-Konzentrationen, die 4,5 - 4,3 % über dem Sollwert lagen. Die Variationskoeffizienten entsprachen denen der Methode I b. Beim Vergleich der Methoden I a und I b anhand der nach beiden Methoden bestimmten Sollgewichte ergab sich eine statistisch auffällige Abweichung der Methode I a von I b (Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %). Wie auch die 5. und 6. Versuchsreihe zeigen, ist die Abweichung

der Methode I a von I b gering. Unter den Umständen der Praxis genügt es daher, mit Hilfe des Faktors (Methode I a) die PSP-Konzentrationen zu ermitteln. Der Standard muß nur dann mit einbezogen werden, wenn das vorhandene Photometer keinen Filter mit der Wellenlänge 546 nm, sondern nur solche mit einem größeren Meßbereich hat und wenn die PSP-Konzentrationen der Ampullen von einer Charge zu anderen stark schwanken. Wir bestimmten den Faktor $F = 1460 \text{ mcg PSP/100 ml}$ als Mittelwert aus der 3. und 4. Versuchsreihe und schlugen diesen Faktor als Richtwert vor, er soll aber jeweils im eigenen Labor mit Ergebnissen nach der Methode I b verglichen und nötigenfalls entsprechend geändert werden. Ob ein Unterschied zwischen der PSP-Bestimmung im Plasma und der im Serum besteht, haben wir nicht untersucht. Wir beschränkten uns auf Untersuchungen im Plasma.

- 4.10. Von einigen Autoren wird lipämiefreies Plasma gefordert. Wir prüften unsere Methoden I a und I b im Plasma von Patienten, die nicht nüchtern waren (Tab. 5, Seite 18). Nach der Bestimmungsmethode I b liegen die PSP-Konzentrationen insgesamt über dem Sollwert, um 5 % bei 300 und 150, um 7,4 % bei 75 und um 7,2 % bei 37,5 mcg PSP/100 ml.

Die Standardabweichung (S) und die Variationskoeffizienten waren nicht so gut wie im Nüchternplasma. Bei der Methode I a lagen die Werte noch höher, die Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten waren gleich oder zum Teil besser als im Nüchternplasma. Bei unseren Versuchen enthielten das Leerplasma und die verschiedenen PSP-Plasmen einer Person gleiche Grade an Lipämie. Diese Voraussetzung ist nicht gegeben, wenn der Patient nicht nüchtern ist und über einen Zeitraum von einer Stunde Blut entnommen wird. Der Grad der Lipämie kann sich innerhalb einer Stunde ändern und durch Lagewechsel beeinflusst werden. Deshalb muß der Patient 10 Stunden vor dem Versuch und während des Versuches nüchtern sein und sitzen- oder liegenbleiben. Bei der Acetonextraktionsmethode von OCHWADT und PITTS spielten unterschiedliche Grade der Lipämie bei den einzelnen Proben keine Rolle, wie einige Autoren angeben (7,8).

- 4.11. FABRICIUS und MAROWSKI geben an, daß ihre Methode auch in hämolytischem Plasma anwendbar ist (2). Wir konnten die PSP-Konzentrationen in hämolytischem Plasma relativ gut rückbestimmen, jedoch etwas ungenauer als im Nüchternplasma. Voraussetzung waren auch hier gleiche Grade an Hämolyse im Leerplasma und

PSP-Probenplasma. In der Praxis wird dieser Fall jedoch nicht auftreten. Der Grad der Hämolyse wird von einer zur anderen Blutentnahme stark variieren. Deshalb müssen wir für unsere Methode fordern, daß das Blut hämolysefrei abgenommen wird. Es muß frei aus der Kanüle abtropfen. Auch eine stärkere Verdünnung der Plasmen (Methode II a + b) mit 2 ml Puffer (pH 11,5) statt 1 ml brachte keine besseren Ergebnisse in hämolytischem und lipämischem Plasma.

Da durch Ansäuern mit dem Puffer II Fa. Haury (pH 3,4) oft zu starke Trübungen auftraten und die Messungen daher zu ungenau wurden, können wir den möglichen Vorteil, daß auch hämolytische Plasmen verwandt werden können, nicht wahrnehmen. HEIDLAND gibt bei hämolytischem Plasma gleiche Volumina Zinkacetat dazu. Leider ist nicht die Konzentration der Zinkacetatlösung angegeben. Wir stellten nach Zugabe von Zinkacetatpulver zu hämolytischem Plasma eine Entfärbung fest, aber gleichzeitig eine sehr starke Eiweißausfällung. Die Acetonextraktionsmethode ist auch im hämolytischen Plasma anwendbar, wie einige Autoren angeben (4.10.).

- 4.12. Heglostix können zum Nachweis von Hämolyse im Leer- sowie im PSP-Plasma verwandt werden (2.3.13.). Zinkacetat- und Puffer (pH 11,5)-Zugabe stören die Reaktion nicht (2.3.10. u. 2.3.12.).

Eine mäßig positive bis stark positive Reaktion ist ein Hinweis auf Hämolyse.

Bei sehr hohen PSP-Konzentrationen um 60 mcg PSP/100 ml, die in der Praxis nie vorliegen werden, kann es zu einer Grün- statt Blauverfärbung der Teststreifen kommen. Entscheidend für die Beurteilung der Reaktion ist die Farbintensität.

Hohe Konzentrationen reduzierender Substanzen wie z.B. Ascorbinsäure, können die Empfindlichkeit der Reaktion der Heglostix verringern. Da beim 10 Stunden lang nüchternen Patienten keine Konzentrationsänderungen innerhalb einer Stunde zu erwarten sind, spielt dies keine Rolle.

ZUSAMMENFASSUNG

Verschiedene Methoden zur PSP-Bestimmung im Plasma wurden auf ihre Anwendbarkeit in der klinischen Routinediagnostik geprüft. Die von OFFERMANN et al. angegebene Methode ergab ca. um 10 % zu hohe PSP-Konzentrationen mit großer Standardabweichung, da die Ergebnisse stark vom pH des Plasmas abhängig sind und durch ungenügende Alkalisierung kein vollständiger Farbumschlag erreicht wird. Das Letztere gilt gleichfalls für die Methode von LAMBERTS et al. Die Variationskoeffizienten sind größer als die der Methode I a. Die Methode SCHWARTZKOPFF ist sehr zeit- und materialaufwendig und ergab wegen der zahlreichen Meßvorgänge und der starken Verdünnung zu hohe PSP-Konzentrationen mit $V = \text{ca. } 20$. Die Versuchsvorschrift von Haury prüften wir besonders ausgiebig. Durch z.T. sehr starke Eiweißausfällung nach Zugabe des sauren Puffers (pH 3,4) wurden die Ergebnisse oft unbrauchbar.

Bei der Methode FABRICIUS-MAROWSKI erhielten wir durch die z.T. starke Eiweißausfällung vom Sollwert stark abweichende PSP-Konzentrationen mit hoher Standardabweichung und hohen Variationskoeffizienten. Als die störunauffälligste erscheint die Acetonextraktionsmethode nach OCHWADT und PITTS. Die Ergebnisse werden durch Hämolyse und verschiedene Grade von Lipämie nicht beeinträchtigt und zeigen eine hohe Meßgenauigkeit. Der Nachteil liegt in der Zahl der Meßvorgänge, was ebenfalls für die Vorschrift von HEIDLAND zutrifft. Sie liefert genaue Werte; für jeden Patienten muß aber eine eigene Eichkurve aufgestellt werden. Bei hämolytischem Plasma wird Zinkacetat zugesetzt, das bei unseren Untersuchungen aber zu starker Eiweißausfällung führte. Sie sind daher beide für die Routine nicht geeignet.

Eigene Ergebnisse:

Die Methode I b liefert exakte Ergebnisse im Konzentrationsbereich um 300 mcg PSP/100 ml bis um 75 mcg PSP/100 ml, bei niederen Konzentrationen ist die Meßgenauigkeit geringer. Ein weiterer Vorteil liegt in der Einfachheit der Methode, dem geringen Zeit- und Materialaufwand. Wie aus Vergleichen mit der Methode I a hervorgeht, ergibt diese gleichwertige Ergebnisse und kann unter den Bedingungen der Praxis angewandt werden. Eine stärkere Verdünnung mit 2 ml statt 1 ml Puffer (pH 11,5) schafft keine Vorteile.

Wir schlagen vor: Der Pat. muß 10 Stunden vorher und während der Untersuchung nüchtern sein. Zur Vermeidung von Änderungen einer eventuell bestehenden Lipämie bleibt er im Zeitraum der Blutentnahme sitzen oder liegen. Das Blut läßt man in Röhrchen, die Heparin enthalten, abtropfen und zentrifugiert es 15 min lang bei ca. 3500 U/min.

Methode 1 b: 1 ml Leerplasma, 1 ml Leerplasma zur Herstellung des Standardplasmas und 1 ml Probenplasma pipettiert man in je eine 1 cm-Küvette, gibt 0,05 ml Standard zu einem Leerplasma und dann jeweils 1 ml Puffer (pH 11,5) Haury in die Küvetten, mischt es gut und mißt sofort im Photometer gegen Aqua dest. mit dem Eppendorf-Photometer bei 546 nm.

Anschließend prüft man mit Heglostix-Teststäbchen, ob eine Hämolyse in den Proben vorliegt. In diesen Fällen, die bei regelrechtem Vorgehen selten sind, muß die Untersuchung wiederholt werden. Auf das Mitführen eines Standards kann verzichtet werden: (Methode 1 a) der notwendige Faktor muß dann in jedem Labor überprüft werden. Als Richtgröße bestimmten wir $F = 1460 \text{ mcg PSP}/100 \text{ ml}$.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Breuning, M. und Indest, K.:
Der intravenöse Phenolrottest beim Kind.
Arch.Kinderhklde. 179, 229-35 (1969)
2. Fabricius, W. und B. Marowski:
Zur Methodik der Phenolrotbestimmung im Serum.
Z.Klin.Chem. 8, 431-3 (1970)
3. Haury, Heinz, Chem. Fabrik, 8 München 23, Postfach 48:
Testvorschrift zur Testpackung
Phenolrot im Serum PSP 60/60
4. Heidland, A.:
Klinisch-experimentelle Untersuchungen über den renalen Phenolsulfonphthalein-Transport.
Klin.Arch.Med. 214, 163-86 (1968)
5. Höffler, D.G., Offermann und H. Frenz:
Der intravenöse Phenolrottest.
Dtsch.Med.Wochschr. 93, 397-402 (1968)
6. Höffler, D., P. Fiegel, B. Korol, D. Müller, L. Horbach:
Einfache Methode zur Erfassung von Austrocknungs- und Überwässerungszuständen:
Die Bestimmung des Extrazellulärraumes mit Phenolrot.
Münch.Med.Wschr. 5, 190-196 (1972)
7. Lamberts, B., E.D. Krückels, R. Heintz:
Der Phenolsulfonphthalein-Test im Vergleich mit anderen Nierenfunktionsuntersuchungen.
Dtsch.Med.Wschr. 95, 2003-11 (1970)
8. Gebrauchsanleitung der Heglostix ^r-Packung Fa. Merck, Darmstadt.
9. Möller, I. und A. Bedö:
Die Phenolsulfonphthalein-Ausscheidung als Funktionsprüfung der Niere.
Ärztl.Wschr. 7, 1125-1130 (1952)

10. Ochwaldt, B.K. und R.F. Pitts:
Disparity between phenol red and diodrast clearances in the dog.
Amer.J.Physiol. 187, 318-322 (1956)
11. Rowtree, L.G. und J.T. Geraghty:
An experimental and clinical study of the phenolsulfonphthalein in relation to renal function in health and disease.
J.Pharmacol.exp.Ther. 1, 579 (1910)
12. Schwartzkopff, W.:
Zur Totalclearance vom Phenolrot bei Normalpersonen.
Z.ges.exp.Med. 150, 120-138 (1969)

Herrn Professor Dr. med. Dietrich Höffler möchte ich
für die Anregung und die Überlassung des Themas sowie
für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung
der Versuche und bei der Abfassung der Arbeit danken.

LEBENS LAUF

Am 10.10.1944 wurde ich als fünftes Kind des Hermann Köth und seiner Ehefrau Eleonore, geb. Rall, in Nossen/Sachsen geboren, wohin unsere Familie aus Wanne-Eickel evakuiert war.

An dem neusprachlichen Sophie-Scholl-Gymnasium in Oberhausen-Sterkrade bestand ich am 22.2.1965 das Abitur. Von dem Sommersemester 1965 ab studierte ich Medizin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz und legte dort am 1.4.1966 das Vorphysikum, am 23.3.1968 das Physikum und am 7.6.71 das medizinische Staatsexamen ab.

Als Medizinalassistentin arbeitete ich an der Universitätsklinik in Mainz:

vom 1.9.1971 - 31.12.1971 in der Augenklinik,

vom 1.1.1972 - 30.4. 1972 in der I. Med. Klinik,

vom 1.5.1972 - 31.8. 1972 in der Chirurgischen Klinik.

